

用于纯化抗原性物质的单克隆抗体亲和层析术(二)

黄嘉陵

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

(四)、蛋白水解的抑制

在分离抗原的过程中,必须保持抗原分子的完整。而组织中存在的蛋白水解酶,却会在这方面招来许多麻烦,因此,应该注意下列几点:

1. 所有溶液均须始终置于冰浴或 4℃。
2. 避免使用酸性蛋白酶活性最高的酸性 pH 溶液。
3. 避免使用为某些蛋白酶活性所必需的双价阳离子,并于所有溶液中加入 5 mM EDTA。
4. 于所有溶液中添加 2.5 mM 碘乙酰胺和 2 mM 苯甲基磺酰氟,以抑制蛋白酶活性。

三、抗原的亲亲和层析纯化

一俟上述一切准备就绪,即可着手进行抗原的亲亲和层析纯化。整个层析过程,如同一般免疫亲和层析,也包括上柱吸附、洗涤和洗脱这三个环节。而每一环节的最适条件,又常因抗原或抗体不同而有所不同。因此,务必事先摸索一下。在预备性小实验取得成功之后,再正式开始亲和层析纯化抗原的工作。

(一)、预备实验

最好先装一根小柱。一般可在底部用多孔塑料板支持的 2 毫升注射器中装入 0.7 毫升亲和胶。在以 5 毫升无去垢剂缓冲液洗涤后,再以 5 毫升含 0.5% 去垢剂的缓冲液平衡。但在抗原液含脱氧胆酸盐时,须选用低盐或高 pH 缓冲液(0.01 M Tris、0.02% NaN₃、pH 8.4),以免溶液变粘。而后,以含 0.5% 去垢剂的低 pH (如 pH 2.6 的 1 M 丙酸)或高 pH (如 pH 11 的 5 M 二乙基胺)溶液预洗,以除去正式洗脱时可以从柱上除去的任何非抗原蛋白。一俟 2~3 毫升洗涤液过程,即须以含 0.5% 去垢剂的

缓冲液洗涤,以将溶液 pH 迅速调回原值。

至此,即可取 4 毫升左右粗制抗原液,按 2 毫升/小时的速度上柱。但在选择缓冲系统时,要注意保持蛋白质的稳定。而上柱抗原的浓度,必须比柱上偶联的抗体稀得多,以便在抗体大大过量的情况下,使平衡有利于抗体-抗原复合物的形成。待 1 毫升抗原液过柱后,再收集 1 毫升流出液,作为吸附后部分用于检测。

然后,以 10—20 毫升含 0.5% 去垢剂的适当缓冲液洗涤。这种洗涤必须相当温和,不致引起抗体-抗原复合物解离;但又必须具有足够强度,否则难以将柱上非特异性吸附的蛋白质除去。在开始洗涤时,务必十分缓慢,以免带走柱中尚未被充分吸附的抗原。

一旦通过测定判明,非特异性吸附的蛋白质已被洗涤除去之后,即可使用解离缓冲液进行洗脱。

同一般免疫亲和层析一样,可以含 0.5% 去垢剂的低 pH、高 pH、高盐或蛋白变性剂溶液进行洗脱(见下表)。

免疫亲和层析洗脱剂举例

类别	名称
酸	0.1—1 M 醋酸(pH 2.0)
	1 M 丙酸(pH 2.6)
	0.1 M 甘氨酸-盐酸(pH 2.0—2.8)
碱	0.05 M 二乙基胺-盐酸(pH 11.5)
	0.01—1 M 氢氧化铵(pH 11)
盐	0.5—3 M 氯化钠
	3 M 硫酸钾
	2.5 M 碘化钠
	2.8 M 氯化镁
蛋白质变性剂	4—8 M 脲素
	6 M 盐酸胍

但要注意,常规免疫血清含有各种不同亲和力的抗体。亲和力低的,即便洗涤,有时也会使其结合的抗原慢慢解离下来;而亲和力高的、非采用蛋白质变性剂,不能使抗原由抗体-抗原复合物解离。因此,通常很难找到一种同时适合血清中各种不同抗体要求的理想洗脱剂。

单克隆抗体则迥然不同,它们各自具有特定的亲和力。因而,不仅有可能早在杂交瘤建株的过程中,即注意选择那些亲和力适中,甚至可于 20 mM 磷酸钾和 750 mM 氯化钠(pH7)那样温和的条件下与抗原解离的单克隆抗体,专门用于亲和层析^[38]。而且,对于已经获得的单克隆抗体,也可以预先通过实验。摸索既能使抗体-抗原复合物解离,又能尽量保持抗体和抗原稳定的洗脱条件。

一个最为简便的办法就是通过 ELISA 测定^[39]。即在正规条件下,先用抗原包被微量酶联免疫测定板。再加入过量的单克隆抗体,使其与抗原形成抗体-抗原复合物。然后,加入不致影响抗体和抗原稳定性的解离缓冲液,让其解离 1—2 小时。再换入酶标记的第二抗体,通过常规的酶反应,即可对每个测定孔中的解离程度作出判断。由此也就可以选出适于亲和层析的单克隆抗体或适于某种单克隆抗体的理想洗脱条件。

不过,上述 ELISA 测定,有时并不完全代表亲和层析柱上的实际情形。由于抗体经过偶联有时会导致亲和力的改变,而往往需要比 ELISA 选定的更强或更弱的条件,方能使柱上的抗体-抗原复合物解离。

洗脱时,可分 6 次加液,每次 0.5 毫升,同时进行分部收集。若采用改变缓冲液 pH 的办法洗脱,收集液应立即中和、稀释或透析,使重新回复最适 pH 环境。例如,以 pH 11.5 的二乙基胺缓冲液洗脱,可预先在收集管中放入固体甘氨酸;而以 1 M 丙酸洗脱,则可用 2 M 或浓度稍低的 Tris 中和。

为了减轻洗脱条件可能对于抗原样品及免

疫亲和胶产生的损害,除可采用凝胶过滤换液外,还可进行反上样方向洗脱,以尽量缩短与洗脱缓冲液接触的时间。

一俟洗脱完毕,即须以 0.15 M NaCl、0.02% NaN₃、0.025 M Tris、pH 7.4 缓冲液,或于脱氧胆酸盐存在时,改用低盐、pH 8.4 的缓冲液,以将柱内 pH 尽速调回生理数值。

最后,通过对上柱样品、吸附后部分及最初四个洗脱分部的抗原检测,即可对分离效果作出判断,也可预示可能出现的一些问题。

至于可能影响柱子重复使用次数的因素,除了洗脱剂的强度之外,还同抗原抽提物中含有的蛋白水解酶密切相关。为此,除如前述,可以适当采取一些抑制蛋白酶活性的措施之外,最好还必须测定一下单克隆抗体对蛋白酶作用的稳定性。如果不知道抗原抽提物中含的是哪种蛋白酶,则可用木瓜蛋白酶和胃蛋白酶测试。使抗体同蛋白酶共育不同时间,然后取样通过凝胶电泳测定分子量,便可对抗体的稳定性作出估计。

(二)、问题及办法

1. 抗原过程毫无滞留 这种情形较少。究其原因可有下列两种:

(1) 抗体亲和力过低。

(2) 抗体因偶联变性,或活性中心被结合,或 Fab 部分处于难以形成抗体-抗原复合物的位置。

前者属系统本身的问题。恐除更换抗体外,别无它法可寻。而后者纯属外因,有可能通过改变实验方法来加以克服。例如,可改用 Protein A-Sepharose 4 B 柱,或抗免疫球蛋白抗体-Sepharose 4 B 柱等非共价结合法联结单抗。也可通过其它反应基团进行偶联,或将溴化氰活化的 Sepharose 4B,于偶联缓冲液中浸泡数小时,先使某些反应基团失活,再同单抗偶联。

2. 抗原活性无法洗脱:可有下列两种情形:

(1) 抗原活性无法洗脱。这可能同单抗的亲和力过高有关,但大多还是由于洗脱条件(如

pH 或离子强度)改变,引起三级结构变异,以致难以触及抗原结合位点。

(2) 抗原可从柱上洗脱,但已变性,以致无法测出抗原活性。

如遇上述情形,可改试其它洗脱方法,或先用一柱体积洗脱液浸泡适当时间,再行洗脱。如仍未奏效,可进一步采用变性技术来洗脱抗原。例如,将吸附有抗原的亲胶,置2%SDS液中沸腾2分钟,即可由亲和胶上洗脱任何非共价结合的抗原物质。

3. 抗体亦被洗脱:这很可能同某些单抗缺乏重链间的二硫键有关,以致抗体半分子易于扭曲而被洗脱。

(三)、抗原的大量纯化

1. 亲和层析:一旦小试验成功,即可参照预备实验的操作程序,进行抗原的大量纯化。

通常,可在底部用多孔塑料板支持的10或20毫升注射器中,装入8—10毫升亲和胶,做成亲和层析柱。取200—500毫升已通过Sephrose 4 B柱,除去非专一性吸附物质的粗制抗原液,按10—20毫升/小时上柱。同时,按每管10毫升分部收集,测定抗原活性,以确定柱子已否饱和。然后,至少以100毫升含0.5%去垢剂的适当缓冲液洗柱。待流出液 $OD_{280\text{ nm}}$ 值小于0.01,即可以约5柱体积洗脱液进行洗脱。同时,按每管5毫升分部收集,并于高pH或低pH洗脱时,作适当中和。最后,将含抗原的各洗脱分部混合按2—4%柱体积,加到同样以含0.5%去垢剂的缓冲液平衡的凝胶过滤柱上,以除去由洗脱或中和带入的其它物质。再将含抗原各部合并,通过适当浓缩,和对含0.5%去垢剂的缓冲液透析,即可分装,贮于-80℃。

2. 纯度鉴定:对按上述方法纯化获得的抗原性物质,首先必须进行抗原检测和蛋白浓度测定,并与纯化各阶段样品作一比较。抗原检测,已在“抗原的增溶溶解”部分中述及。蛋白浓度测定,则可按Lowry法进行。惟样品所含之去垢剂,往往会形成沉淀,而干扰颜色反应。

但在碱性铜试剂中添加1%的SDS,以及在制作标准曲线时加入与样品相同浓度的去垢剂,即可加以克服。

然后,通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶板电泳,进行纯度鉴定。若抗原分子量未知,最好开始同时使用高(如12%)、低(如6%)两种凝胶浓度。由于样品浓度一般较低,为保证上样量不低于10—20微克蛋白,胶板可稍厚,以3毫米为宜。如仍不能满足要求,可将样品再作冰干浓缩。

由于膜抗原常属糖蛋白,故于电泳末了,应对胶板作蛋白质和糖类两种染色。若经两种染色后,仅见一条电泳区带。一般便可据此认为,此带就是靶抗原。但这未必十分可靠。因此,在获得其它确证之前,最好改在0.1%SDS和样品不作沸腾处理的温和条件下,再走一次电泳。然后,通过切片,抽提,便可直接测定证明,是否确系靶抗原。此外,通过电泳,将胶板上的电泳区带转移到硝酸纤维素滤膜上,再用单抗和带标记的抗免疫球蛋白抗体定位,也可作出明确的判断。

相反,若除抗原蛋白区带外,还存有其它电泳区带,则须根据不同使用要求,再作进一步纯化。

最后,根据上述检测结果,即可算出单抗亲和层析纯化抗原的产率和纯化率。

参 考 文 献

- [1] Köhler, G. and Milstein, C., 1975 Nature, 256: 495.
- [2] Milstein, C. et al., 1980 Progress in Immunology IV, Edited by Fougereau, M. and Dausset, J., 17—33, Academic Press.
- [3] Sunderland, C. A. et al., 1979 Eur. J. Immunol., 9: 155.
- [4] Parham, P., 1979 J. B. C., 254: 8709.
- [5] Dalchau, R. et al., 1980 Eur. J. Immunol., 10: 737.
- [6] Dalchau, R. et al., 1980 Eur. J. Immunol., 10: 745.
- [7] Secher, D. S. and Burke, D. C., 1980 Nature 285: 446.
- [8] Fass, D. N. et al., 1982 Blood 59: 594.

- [9] Goodall, A. H. et al., 1982 *Protides Biol. Fluids*, 30: 403.
- [10] Nielsen, L. S. et al., 1982 *Biochemistry* 21:6410
- [11] Yanagawa, S-i et al., 1984 *J. Biol. Chem.*, 259: 2707.
- [12] Ridgway, E. C. et al., 1982 *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 55:44.
- [13] Vetterlein, D. and Calton, G. J., 1983 *Thromb. Haemostasis*, 49: 24.
- [14] Gee, N. S. et al., 1983 *Biochem. J.*, 214: 377.
- [15] Kennedy, S. M. E. and Burchell, B., 1983 *Biochem. Pharmacol.*, 32: 2029.
- [16] Hanseu, R. S. and Beavo, J. A., 1982 *PNAS*, 79: 2788.
- [17] Banks, L. et al., 1983 *J. Gen. Virol.*, 64: 2249.
- [18] Matsumura, F. et al., 1983 *J. Biol. Chem.*, 258:6636.
- [19] Heikinheimo, M. et al., 1983 *J. Immunol. Methods*. 60:25.
- [20] Simmonds, R. G. et al., 1983 *Protides Biol. Fluids*, 31:917.
- [21] Adams, D. J. et al., 1983 *Endocrinology*, 113:415.
- [22] Nakayama, H. et al., 1982 *PNAS*, 79: 7575.
- [23] Russo, A. J. et al., 1983 *Toxicol.*, 21:166.
- [24] Buchanan, R. R. C. et al., 1983 *Clin. Exp. Immunol.*, 51:8.
- [25] Paul, S. et al., 1982 *Immunol. Factors Hum. Contracept.*, (Int. Med), (03-12).
- [26] Mescher, M. F. et al., 1983 *Methods Enzymol.*, 92 (Immunochem.) Tech., Pt. E): 86.
- [27] McKenzie, J. L. and Fabre, J. W., 1981 *J. Immunology*, 126: 843.
- [28] Cotter, T. G. and Menson, P. M., 1982 *Biochem. Soc. Trans.*, 10:167.
- [29] August, J. T. et al., 1981 *Expression Differ. Funct. Cancer Cells*, (Proc. Workshop) 1st:79, (Pub. 1982).
- [30] Barclay, A. N. and Ward, H. A., 1982 *Eur. J. Biochem.*, 129:447.
- [31] Wright, I. G. et al., 1983 *Infect. Immunology* 41:244.
- [32] Kasper, L. H. et al., 1983 *J. Immunol.*, 130:2407.
- [33] Fraser, C. M. et al., 1983 *J. Cell Biochem.*, 21: 219.
- [34] Low, D., 1983 *Biotech* 83, 823—832. Online, Northwood.
- [35] Balchau, R. and Fabre, J. W., 1982 *Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine*, edited by McMichael, A. J. and Fabre, J. W., 519—556, Academic Press.
- [36] Heyningen, V. V. et al., 1983 *J. Immunol. Methods*, 62: 147.
- [37] Griswold, W. R. and Nelson, D. P., 1984 *Immunol. Letters*, 7:229.
- [38] Cobbs, C. S. et al., 1983 *Toxicol.*, 21: 385.
- [39] Calton, G. J., 1984 *Methods in Enzymology*, 104: 381.

建国以来我国自建的一些细胞株或系(五)

小鼠 S₁₈₀-V 细胞系

S₁₈₀-V 细胞系来自小鼠 S₁₈₀ 实体瘤(肉瘤 S₁₈₀ 是 1914 年纽约 Crocker 实验室的一只雄鼠腋部自发肿瘤, 当时诊断为癌。于 1919 年前转变为肉瘤, 此后组织形态未发生进一步改变)。本系细胞供瘤鼠来自药物研究所。1978 年初, 采用细胞悬液静置培养, 培液里含 10—

20% 灭活小牛血清的 RPMI—1640。每 2—3 天换液一次, 4—7 天传代一次。细胞在体外稳定生长。该细胞形状不一, 膜边缘不光滑, 常见多形性突起。除贴壁外, 约 40% 细胞呈悬液生长。群体倍增时间 14—22 小时。染色体众数值 88。每细胞中约 5—20% 为中或亚中着丝点染色体, C 带染色发现属中双着丝点。以 2×10^6 /ml 细胞皮下接种于小鼠, 14 天后长出